

**Darstellung und einige Eigenschaften
des Cytochrom c aus dem Oligochäten
Ringelwurm Tubifex**

1968

von

Arnulf Hennig

aus

Nietleben-Halle/Saale



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546214_0050

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med. Dr. phil. F. May

Darstellung und einige Eigenschaften des Cytochrom c aus dem Oligochäten Ringelwurm Tubifex

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Arnulf Hennig
aus
Nietleben-Halle/Saale

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. A. Kröncke

Referent: Univ.-Doz. Dr. H.-J. Horstmann

Korreferent: Prof. Dr. Dr. May

Tag der mündl. Prüfung: 5. 11. 1968

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung	S 1
Material und Methoden	S 2 - S 9
Extraktion	S 3
Reinigung des Cytochrom c	S 3
Tryptische Spaltung des Cytochroms	S 4
Auftrennung der Peptide	S 5
Extinktionsmessung und Mengenbestimmung	S 6
Disk-Elektrophorese	S 7
Markierung des Cytochrom c mit 1-Di- methylamino-naphthalin-5-sulfonylchlorid (DANS-Cl)	S 8
Ergebnisse	S 9 - S 16
Vergleich der tryptischen Peptide	S 12
Disk-Elektrophorese	S 15
Markierung des N-terminalen Endes des Cytochrom c mit 1-Dimethylamino- naphthalin-5-sulfonylchlorid	S 16
Diskussion	S 17 - S 22
Zusammenfassung	S 22
Literaturverzeichnis	S 23 - S 24
Lebenslauf	S 26

Cytochrom c ist eines der elektronenübertragenden Fermente der Atmungskette. Es ist ein niedermolekulares Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 12500. Cytochrom c setzt sich aus einem eisenhaltigen Porphyrinring und einer Eiweißkomponente zusammen. Der Proteinanteil besteht aus 104 bis 108 Aminosäuren und ist durch zwei Cysteinreste mit zwei Vinylgruppen des Eisenporphyrins verbunden.

In den letzten Jahren wurde die Primärstruktur des Cytochrom c bei verschiedenen Organismen aufgeklärt (1a). Als Ausgangsmaterial für die Isolierung und Untersuchung des Cytochrom c wurden am häufigsten Herzen von Vertebraten gewählt, da der Herzmuskel besonders reich an leicht extrahierbarem Cytochrom c ist (2). Von den niederen Organismen wurde bisher die Struktur des Cytochrom c der Hefen *Saccharomyces cerevisiae* (3) und *Candida krusei* (4), der Motte *Samia cynthia* (5) und von *Neurospora crassa* (6) bestimmt.

Die Aminosäuresequenz des Cytochrom c aller bisher untersuchten Organismen zeigte so große Ähnlichkeit, daß daraus auf eine gemeinsame Abstammung des Cytochrom c geschlossen werden konnte. Beim Vergleich der Primärstrukturen des Cytochrom c verschiedener Spezies kann die Veränderung während der Phylogenese beobachtet werden. So kann an Hand eines Moleküles die entwicklungsgeschichtliche Verwandtschaft verschiedener Organismen deutlich werden. In die Beziehung zwischen Gen, Primärstruktur und physiologischer Funktion läßt sich in eindrucksvoller Weise Einblick gewinnen (2,7,31). Deshalb ist es von Wichtigkeit, das Cytochrom c zahlreicher Organismen darzustellen, seine Eigenschaften zu untersuchen und seine Struktur zu bestimmen.

Wir wählten als Untersuchungsobjekt das Cytochrom c des Oligochäten *Tubifex*, um es mit den bekannten Cytochromen anderer Spezies zu vergleichen und um festzustellen, wie es in seinen Eigenschaften von den Cytochromen der Wirbeltiere und von denen der niederen Organismen abweicht.

MATERIAL UND METHODEN

Als Ionenaustauscher wurde Amberlite IRP 64 (NH_4 -Form, Reinheitsgrad - pract.) vom Serva - Entwicklungslabor, Heidelberg verwendet.

Der Natriumphosphat-NaCl-Puffer bestand aus 60mM Natriumphosphat, p_H 7,5, dem Natriumchlorid bis zu einer Konzentration von 0,4M hinzugefügt wurde.

Sephadex G-25 und G-75 wurden von der Pharmacia Uppsala, Schweden, bezogen.

Das Trypsin (2x krist., lyophilisiert, reinst, salzfrei) stammte vom Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.

Pferdeherz-Cytochrom c wurde von C.F.Boehringer und Soehne, Mannheim, erworben.

Das Karpfenherz-Cytochrom c stellte freundlicherweise Herr L. Gürtler (Erlangen) zur Verfügung.

Die Ringelwürmer wurden von einer zoologischen Handlung bezogen. Neben *Tubifex tubifex* enthielten die Proben zu etwa 10% *Tubifex albicola*.

Gelfiltration: Zur Gelfiltration dienten Säulen vom Typ K25/45 mit einem Durchmesser von 2,5cm und einer Länge von 45cm und vom Typ K15/30 mit einem Durchmesser von 1,5cm und 30cm Länge. (Fa. Pharmacia Uppsala, Schweden). Das *Tubifex* Cytochrom c wurde durch Sephadex G-75 in der Säule vom Typ K25/45 gereinigt. Es wurden 31mg Cytochrom c in 4,5ml Natriumphosphat-NaCl-Puffer aufgetragen. Die Höhe des Säulenbettes betrug 32cm. Der Lauf fand im Natriumphosphat-NaCl-Puffer statt. Die Ausflußgeschwindigkeit betrug 4,3ml/Std. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 2ml gesammelt.

In einer Säule vom Typ K15/30 wurde das *Tubifex* Cytochrom c über Sephadex G-25 entsalzt. Die Höhe des Säulenbettes betrug 22cm. Pro Lauf wurden 4 - 6ml Cytochrom c Lösung in Natriumphosphat-NaCl-Puffer aufgetragen. Die Ausflußgeschwindigkeit betrug 2ml/Min.

Elektrophorese: Die Elektrophorese wurde im Hochspannungs-Elektrophoresegerät "Original Frankfurt" (Hormuth/Vetter, Heidelberg) im Gemisch Pyridin/ Eisessig/ Wasser 100/10/890, p_H 6,5, ausgeführt. Die Dauer betrug 70 Minuten bei 750 Volt und 24mA.

Chromatographie: Die Chromatographie wurde senkrecht zur Richtung der elektrophoretischen Trennung im System Pyridin/ Eisessig/ n-Butanol/ Wasser 40/14/68/25 ausgeführt.

Extraktion

Es wurden je Arbeitsgang 1600 bis 1800g Würmer verwendet. Die Würmer wurden 24 Stunden in fließenden kalten Wasser gespült, in Portionen zu 200g mit dem "Starmix" homogenisiert und mit destilliertem Wasser auf das fünf- bis sechsfache des Ausgangsvolumens verdünnt. Die Lösung wurde durch Zusatz von Schwefelsäure auf p_H 4,0 eingestellt und 2 - 3 Stunden gerührt. Nach Abzentrifugieren des Unlöslichen wurde der Überstand mit Ammoniakwasser neutralisiert und erneut zentrifugiert. Zur Adsorption des Cytochrom c wurde der Überstand mit 32g Amberlite IRP 64 verrührt (8). Ein Teil des adsorbierten Fremdproteins wurde durch Waschen des Austauschers mit 2mM Ammoniakwasser entfernt. Der beladene Austauscher wurde anschließend in einem Chromatographie-Rohr von 2,5cm Durchmesser auf 10g unbeladenen, mit 2mM Ammoniakwasser äquilibriertem Austauscher geschichtet und mit 2M Natriumacetat eluiert (9). Alle Arbeitsschritte wurden bei einer Temperatur von 3 - 5°C ausgeführt.

Reinigung des Cytochrom c

Das Eluat, welches das Cytochrom c enthält, wurde mit Schwefelsäure auf p_H 5,0 eingestellt (10) und unter beständi-

gem Rühren mit 30g festem Ammoniumsulfat pro 100ml Lösung versetzt. Das ausgefallene farblose Protein wurde abzentrifugiert. Nach erneuter Zugabe von 20g Ammoniumsulfat pro 100ml Lösung wurde eine weitere farblose Proteinfraction abzentrifugiert. Das Ammoniumsulfat wurde aus dem Cytochrom c haltigem Überstand durch Dialyse gegen 2mM Ammoniakwasser entfernt. Nach der Dialyse wurde die Cytochromlösung gefriergetrocknet, in Natriumphosphat-NaCl-Puffer gelöst und abschließend einer Gelfiltration über Sephadex G-75 in dem Natriumphosphat-NaCl-Puffer unterworfen (8).

Tryptische Spaltung des Cytochroms

Je 10mg durch Gelfiltration über Sephadex G-25 entsalztes Cytochrom c wurden bei 37°C mit unterschiedlichen Mengen Trypsin in 1ml Ammoniumcarbonat-Lösung inkubiert (11). (siehe Tabelle 1)

Tabelle 1. Spaltungszeiten und Trypsinmengen bei der tryptischen Spaltung von Pferde-, Karpfen- und Tubifex-Cytochrom c.

Tierart	Cytochrommenge	Trypsinmenge	Spaltungszeit
Pferd	10mg	0,1mg	120Min
Karpfen	10mg	0,2mg	240Min
Tubifex	10mg	0,4mg	180Min

Die Trypsinkonzentration wie auch die Reaktionszeit mußten variiert werden, da die verschiedenen Cytochrome eine unterschiedliche Stabilität gegenüber proteolytischen Enzymen besitzen (5). Unter den oben angegebenen Bedingungen konnte eine vollständige tryptische Spaltung des Cytochrommoleküls erreicht werden.

Nach Ablauf der angegebenen Spaltungszeit wurde das Trypsin durch Erhitzen auf 60°C gefällt und abzentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde im Rotationsverdampfer vertrieben und der Rückstand in 0,35 - 0,4ml destilliertem Wasser gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 25 - 30mg Peptid/ml Wasser.

Auftrennung der Peptide

Die tryptischen Peptide wurden durch Elektrophorese und Chromatographie nach der Fingerprinttechnik von Th. Wieland (12) auf Kieselgel-Stärke-Platten (20 x 20, 0,3mm Schichtdicke) aufgetrennt. Pro Platte wurde 0,01ml Peptidlösung aufgetragen. Die Elektrophorese wurde im Gemisch Pyridin/ Eisessig/ Wasser = 100/10/890, p_H 6,5, ausgeführt. Die Chromatographie wurde senkrecht zur Richtung der Elektrophorese im Gemisch Pyridin/Eisessig/n-Butanol/Wasser = 40 : 14 : 68 : 25 ausgeführt. Der chromatographische Lauf wurde nach Zwischentrocknen noch zweimal wiederholt. Die Peptide wurden mit Ninhydrin nachgewiesen. Für histidin-, tryptophan- und tyrosinhaltige Peptide wurden folgende Spezialfärbungen verwendet:

Histidin (13) : Gleiche Teile von p-Anisidin (1%ige salzsaure alkoholische Lösung) und 10% Amylnitrit in Äthanol wurden gemischt und einige Minuten stehen gelassen. Nach dem Besprühen wurden die Platten an der Luft getrocknet und einer Ammoniakatmosphäre ausgesetzt. Histidinhaltige Peptide erschienen als dunkelrote Flecken.

Tryptophan (14) : Beim Besprühen der Platten mit einer frisch hergestellten Mischung von 1g p-Dimethylaminobenzaldehyd, 90ml Aceton und 10ml konzentrierter Salzsäure gaben tryptophanhaltige Peptide eine rotviolette Färbung.

Tyrosin (15) : Die Platten wurden mit einer 0,1%igen alkoholischen α -Nitroso- β -naphtollösung besprüht. Nach Luft-

trocknen und erneutem Besprühen mit wässriger 10%iger Salpetersäure trat beim Trocknen im Brutschrank (3min, 100°C) eine rötliche Färbung auf.

Extinktionsmessung und Mengenbestimmung

Die Spektren des Cytochroms wurden mit dem registrierenden Spektralphotometer DK 2 (Beckman, München) aufgezeichnet. Das Cytochrom c wurde für die Messung in Natriumphosphat-NaCl-Puffer gelöst. Um die Extinktion des reduzierten Cytochrom c zu bestimmen, wurde festes Natriumdithionit zugegeben, bis die volle Reduktion erreicht war. Oxydiert wurde das Cytochrom c mit Kaliumferricyanid.

Mit dem Spektralphotometer PMQ II (Carl Zeiss) wurden die Extinktionen bei der Wellenlänge 280m μ , für das reduzierte Cytochrom c bei den Wellenlängen 550m μ (= E_{550r}) und bei 535m μ (= E_{535r}) gemessen.

Für die Mengenbestimmung wurde die Differenz der Extinktionskoeffizienten des reduzierten Cytochroms bei den Wellenlängen 550m μ und 535m μ bestimmt. Flatmark stellte für das Rindercytochrom fest, daß die Differenz der spezifischen Extinktionskoeffizienten bei diesen Wellenlängen $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 18,08$ ist (8). Wir nahmen an, daß dieser Wert auch für andere Spezies Gültigkeit besitzt, da die Extinktion bei den Wellenlängen 550m μ und 535m μ durch den Porphyrinring bedingt ist (1b) und eine Zahl von 104 bis 108 Aminosäuren bei Cytochrom c Molekülen vorausgesetzt werden kann.

Als Maß für den Reinheitsgrad des extrahierten Tubifex Cytochrom c wurde das Verhältnis aus den Extinktionen bei den Wellenlängen 550m μ (reduziertes Cytochrom c) und 280m μ (oxydiertes Cytochrom) verwendet. Dieses Extinktionsverhältnis wird im folgenden Text als E_{550r}/E_{280} bezeichnet (8).

Disk-Elektrophorese

Die Disk-Elektrophorese wurde nach dem Verfahren von Taber ausgeführt (16). Die Gele wurden in Glasröhrchen von 5mm Breite und 6,2cm Länge gegossen. Es wurden folgende Puffer und Acrylamidlösungen verwendet (16).

(a) Glycin	19g	(b) 1N KOH	48ml
Temed ^{1.)}	0,077ml	Glycin	4,8ml
Wasser zu	100ml	Temed	0,46ml
p _H 7,2		Wasser zu	100ml
		p _H 10,3	

(c) Acrylamid	60g	(d) Acrylamid	10g
Bis ^{2.)}	1,6g	Bis	2,5g
Wasser zu	100ml	Wasser zu	100ml

(e) Ammoniumpersulfat	0,14g	Elektrodenpuffer:	
Wasser zu	100ml	Glycin	13,7g
		2,6-Lutidine	38,2ml
		wasser zu	1 Liter
		p _H 8,3	

Der Elektrodenpuffer wurde vor der Verwendung mit Wasser im Verhältnis 3 : 10 verdünnt.

Die Gele wurden aus folgenden Lösungen hergestellt:

Untergel (7,5% Acrylamid)	Obergel (2,5% Acrylamid)
6 Teile Grundlösung a	1 Teil Grundlösung b
1 Teil Grundlösung c	2 Teile Grundlösung d
1 Teil Grundlösung e	1 Teil Grundlösung e
	4 Teile Wasser

1.) Temed - N,N,N,N,-tetramethyläthylen-diamin

2.) Bis - N,N-methylenbisacrylamid

Das Untergel wurde nach dem Mischen in die Glasröhre gefüllt, mit einer dünnen Wasserschicht bedeckt und 30 Minuten bei 37°C zum Polymerisieren stehen gelassen. Anschließend wurde auf das Untergel 0,2ml Obergel gefüllt, welches ebenfalls mit einer Wasserschicht bedeckt wurde. Die Polymerisation des Obergels fand unter Lichtbestrahlung in 30 Minuten statt. Aufgetragen wurde pro Gelsäule 0,05 - 0,15mg Cytochrom c vom Pferd, Karpfen und Tubifex. Das Cytochrom c wurde in 10 μ l destilliertem Wasser gelöst, mit demselben Volumen gesättigter Rohrzuckerlösung gemischt und auf das Obergel aufgetragen. Die Stromstärke betrug 3mA. Nach 18 bis 21 Minuten stieg die Spannung auf 300 Volt an. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Elektrophorese beendet. Das Protein wurde in den Gelen mit Amidoschwarz 10 B gefärbt. Das Gel wurde mit 7,5%iger Essigsäure oder durch Elektrophorese entfärbt.

Markierung des Cytochrom c mit 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonylchlorid (DANS-Cl)

Die Markierung mit DANS-Cl fand nach der Methode von Schmer statt (17). Es wurden 0,1mg Cytochrom c in 0,2ml 0,1N NaHCO₃ gelöst. 0,5mg DANS-Cl in 0,2ml Aceton wurden mit der Cytochromlösung vermischt und bei 20°C für 12 Stunden in einer Hydrolysierampulle von 2ml Volumen inkubiert. Das markierte Cytochrom wurde im Exsikkator über NaOH und konzentrierter Schwefelsäure getrocknet, in 0,2ml destilliertem Wasser suspendiert und für 48 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert. Das Cytochrom wurde erneut im Exsikkator getrocknet, in 0,1ml 6N HCl gelöst und für 6 Stunden bei 110°C hydrolysiert. Die Salzsäure wurde im Exsikkator über NaOH aus dem Hydrolysat entfernt und der Rückstand in Methanol gelöst. Die Trennung der fluoreszenzmarkierten Aminosäuren erfolgte auf Kieselgel-G-Platten (20 x 20, 0,25mm Schichtdicke) in einer Kombination von drei Steigmitteln (18).

Methylacetat/Isopropanol/25% NH ₃	45:35:20
Chloroform/Methanol/Eisessig	75:25: 5
Chloroform/Äthylacetat/Methanol/Eisessig	30:50:20:1

In den Fällen, wo eine eindeutige Identifizierung der markierten Aminosäuren nicht möglich war, wurden zusätzlich die von Morse (19) angegebenen Steigmittel zur dünn-schicht-chromatographischen Trennung der DANS-Cl Aminosäuren verwendet.

Benzol/Pyridin/Eisessig	80:20:2
Chloroform/tert.Amylalkohol/Eisessig	70:30:3
Chloroform/tert.Amylalkohol/Ameisensäure	70:30:1
Chloroform/tert.Amylalkohol/Eisessig	70:30:0,5

Die feuchten Platten wurden anschließend im UV-Licht betrachtet (360m/μ). Die markierten Aminosäuren erschienen als gelbe fluoreszierende Flecken.

ERGEBNISSE

Mit dem oben angegebenen Verfahren konnten aus 13,6kg Würmern folgende Mengen Cytochrom c erhalten werden. (siehe Tabelle 2)

Tabelle 2. Menge und Reinheitsgrad des Tubifex-Cytochrom c nach den verschiedenen Aufarbeitungsschritten.

Arbeitsschritt	Cytochrommenge	Extinktionsverhältnis E _{550red} /E ₂₈₀
Säureextraktion	123mg	0,30
Ammoniumsulfatfällung (50g zu 100ml Lösung)	80mg	0,59
Dialyse gegen 2mM Ammoniumwasser	57mg	0,68

Die weitere Reinigung des Tubifex Cytochrom c konnte mit

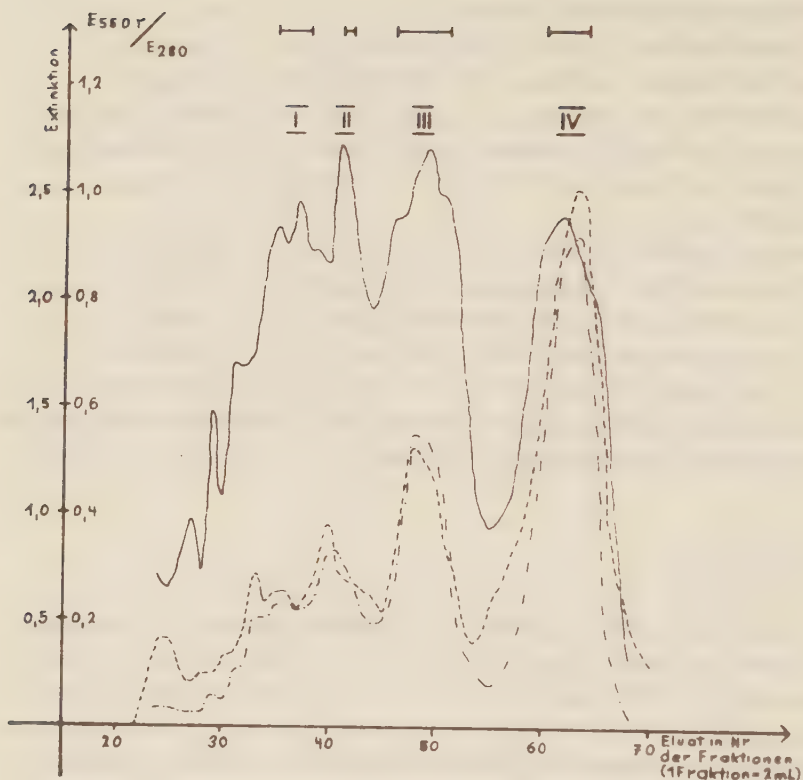


Abb.1. Das Elutionsmuster von Tubifex Cytochrom c nach Gelfiltration auf Sephadex G-75. ----: Extinktion des Cytochroms bei 280m μ . - · - · - : Extinktion des reduzierten Cytochroms bei 550m μ . —: Extinktionsverhältnis E_{550r}/E_{280} .

Hilfe der Gelfiltration über eine Sephadex G-75 Säule erreicht werden. Bereits kurze Zeit nach Beginn der Gelfiltration war eine Auftrennung in drei rote Zonen zu bemerken, die langsam die Säule abwärts wanderten. Die einzelnen Fraktionen wurden gesammelt und deren Extinktion bestimmt. (siehe Abbildung 1).

Durch Gelfiltration über eine Sephadex G-75 Säule konnte das extrahierte und durch Ammoniumsulfatfällung gereinigte Cytochrompräparat in vier verschiedene Komponenten (I bis IV) aufgetrennt werden. Die Fraktionen des Eluates, die die gleiche Komponente enthielten, wurden vereinigt, durch Gelfiltration über eine Sephadex G-25 Säule entsalzt, gefriergetrocknet und getrennt untersucht (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3. Die vier Cytochrome, in die sich das extrahierte und gereinigte Tubifex Cytochrom c-Präparat durch Gelfiltration über eine Sephadex G-75 Säule unterteilen ließ.

Cytochrom c (Komponente)	Fraktion	Volumen (ml)	E_{550r}/E_{280}		Menge (mg)
			Bereich	Max.	
I	35 - 38	8	0,89-0,93	0,99	1,4
II	41 - 42	4	1,01-1,09	1,09	0,9
III	46 - 51	12	0,95-0,99	1,08	4,6
IV	60 - 64	10	0,84-0,90	0,96	7,7

Das Extinktionsverhältnis E_{550r}/E_{280} , das ein Maß für die Reinheit des extrahierten Cytochrom c ist, erreicht den Wert von 1,08 bis 1,09. Dieser Wert wurde am Cytochrom c II in der Fraktion 42 und am Cytochrom c III in der Fraktion 49 gemessen.

Die Spektren aller vier Tubifex Cytochrome waren identisch. Sie wiesen die für Cytochrom c typischen Kurven auf (siehe Abbildung 2). Maxima des reduzierten Cytochroms lagen bei den Wellenlängen 415m/ μ , 516m/ μ und bei 550m/ μ , ein Minimum lag bei 535m/ μ . Das oxydierte Cytochrom c besaß bei den Wellenlängen 406m/ μ und 520m/ μ je ein Maximum.

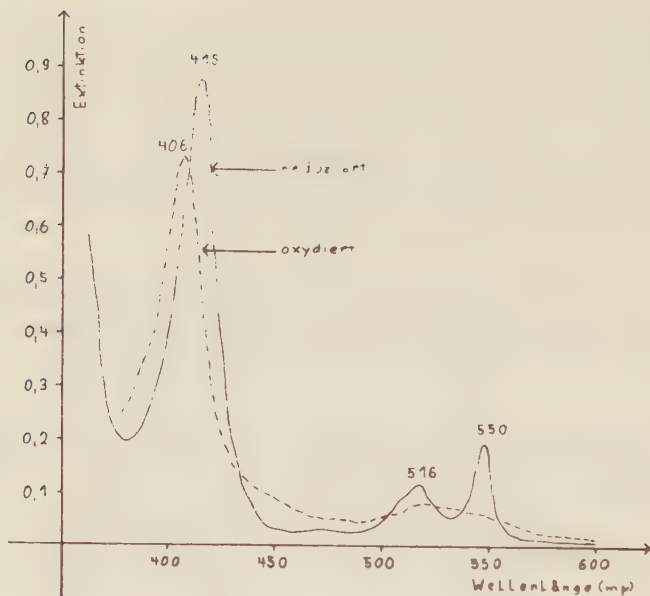


Abb. 2. Absorptionskurve des Cytochroms von Tubifex. Das Cytochrom c wurde in Natriumphosphat-NaCl-Puffer, p_H 7,2, gelöst.

Vergleich der tryptischen Peptide

Die Peptidmuster des tryptischen Hydrolysates von Pferde-Karpfen- und Tubifex-Cytochrom c IV wurden verglichen. Mit der Fingerprinttechnik von Th. Wieland und anschließender Färbung wurden folgende Ergebnisse erhalten. (siehe Tabelle 4 und Abbildung 3)

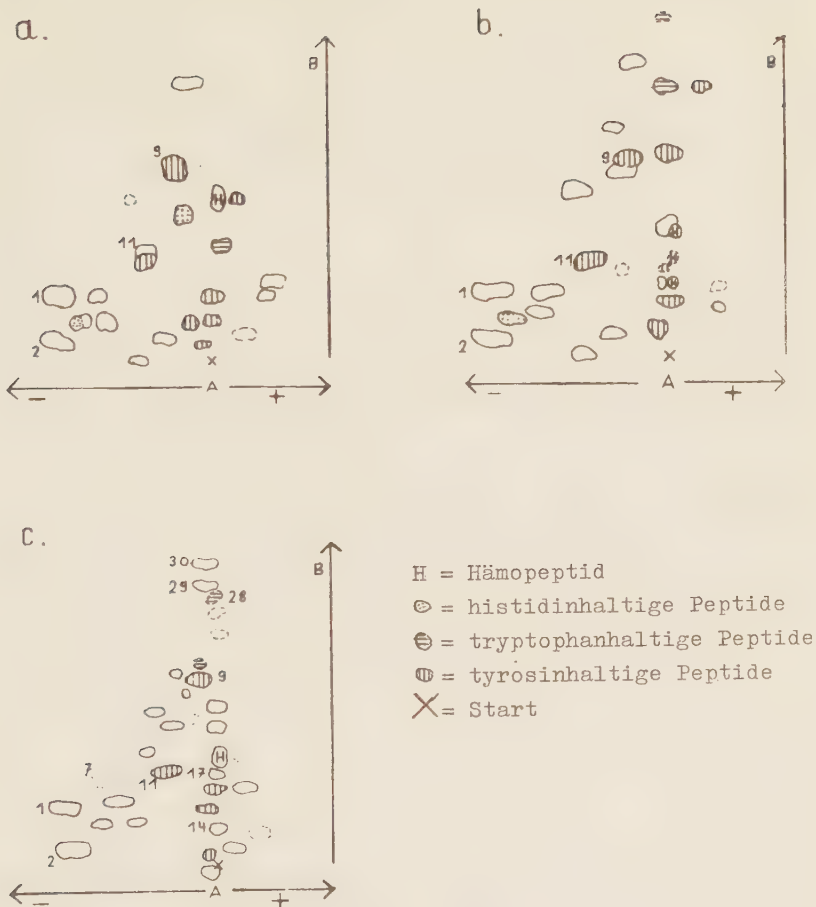


Abb. 3. Fingerprint - Muster der tryptischen Peptide aus dem Cytochrom c von a)Pferd, b)Karpfen, c)Tubifex.

A:Elektrophorese in Pyridin/Eisessig/Wasser - 100/10/890,

p_H 6,5 bei 24mA, 750 Volt und 70 Minuten.

B:Chromatographie, dreimal hintereinander aufsteigend in Pyridin/Eisessig/n-Butanol/Wasser - 40/14/68/25.

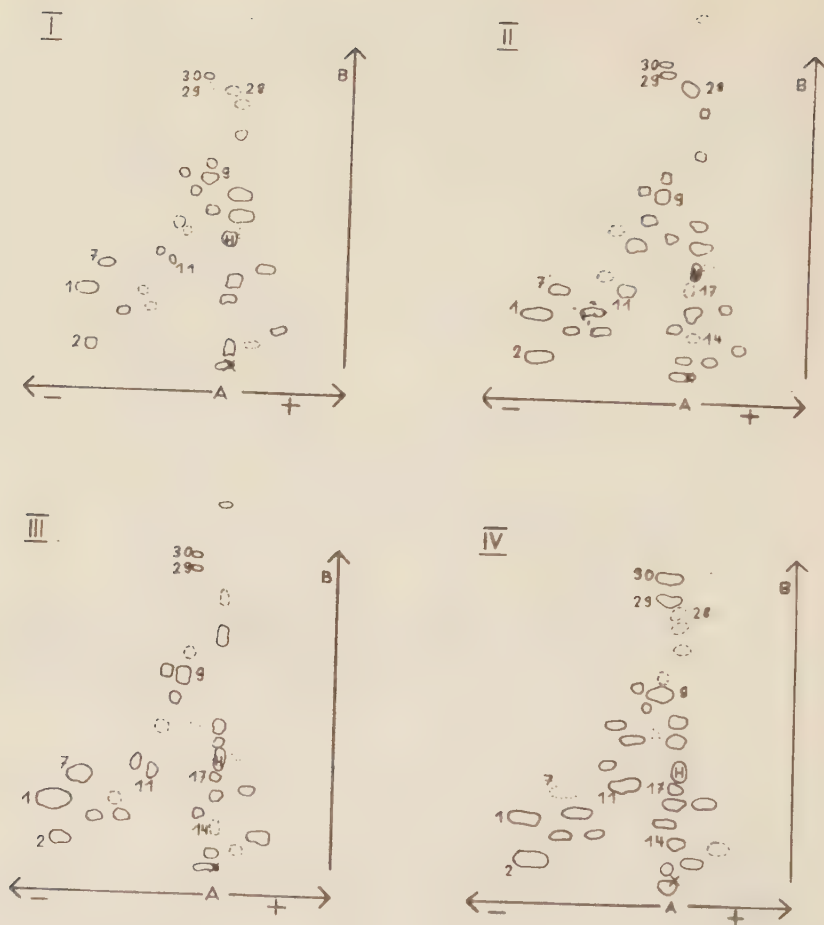


Abb. 4. Fingerprint - Muster der tryptischen Peptide der vier Tubifexcytochrome I,II,III,IV, die sich durch Gelfiltration über eine Sephadex G-75 Säule trennen ließen.
A:Elektrophorese in Pyridin/Eisessig/Wasser - 100/10/890, pH 6,5 bei 24mA, 750 Volt und 70 Minuten Dauer.
B:Chromatographie, dreimal hintereinander aufsteigend in Pyridin/Eisessig/n-Butanol/Wasser - 40/14/68/25.

Tabelle 4. Vergleich der Peptidmuster des tryptischen Hydrolysates von Pferde-, Karpfen- und Tubifex-Cytochrom c IV.

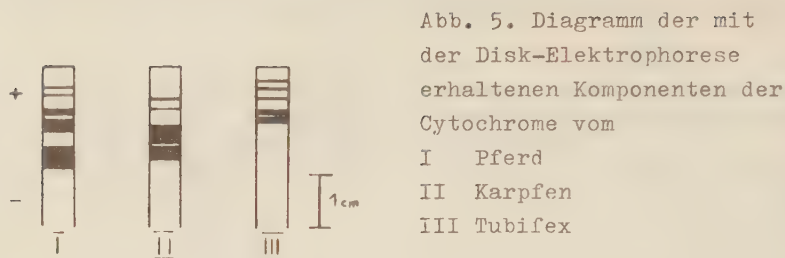
Tierart	Peptidzahl	Zahl der Hämopeptide	Zahl der Histidinp.	Zahl der Tryptophanp.	Zahl der Tyrosinp.
Pferd	22	1	2	1	7
Karpfen	27	3	1	2	7
Tubifex	29 - 30	1	0	2	5

Das Hämopeptid wurde hier nicht als histidinpositiv gerechnet, da auf Grund seiner roten Eigenfarbe die Histidinfärbung mit p-Anisidin nicht ganz eindeutig war. Einige schwach gefärbte Peptide wurden nicht gezählt.

Die Fingerprint-Muster der tryptischen Peptide der vier Tubifex Cytochrome zeigen Differenzen. Es wechselt die Intensität der homologen Peptide der verschiedenen Cytochrome (siehe Abbildung 4). Das basische Peptid 7 ist auf der Platte des tryptischen Hydrolysates des Cytochrom IV kaum zu erkennen. Die Peptide 14 und 17 fehlen auf der Platte des Cytochrom I. Besonders große Unterschiede in der Farbtintensität zeigten die Peptide 28, 29 und 30.

Disk-Elektrophorese

Das Cytochrom c vom Pferd, Karpfen und das Cytochrom IV vom Tubifex wurden mit der Disk-Elektrophorese auf Reinheit und Einheitlichkeit untersucht. Das Cytochrom c des Pferdes und des Tubifex ließ sich jeweils in fünf Komponenten, das des Karpfens in vier Komponenten auftrennen (siehe Abbildung 5). Beim Pferde-, Karpfen-, wie auch beim Tubifex Cytochrom c färbten sich die schnell zur Kathode wandernden Komponenten mit Amidoschwarz am intensivsten. Sie waren schon mit bloßem Auge als scharf begrenzte rote Zonen zu erkennen. Die anderen Komponenten wurden erst nach Färbung mit Amidoschwarz als



sehr schwache Zonen sichtbar. Unter den gleichen Bedingungen der Elektrophorese nahm die Wanderstrecke des Tubifex Cytochrom c gegenüber der des Pferde- und Karpfencytochroms sehr stark ab.

Markierung des N-terminalen Endes des Tubifex Cytochrom c mit 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonylchlorid (DANS-Cl)

Bei einer zur Markierung eingesetzten Proteinmenge von 0,1 bis 0,25mg Tubifexcytochrom c konnten dünnstichtchromatographisch ϵ -DANS-Lysin, O-DANS-Tyrosin, DANS-OH und eine Reihe fluoreszierender Artefakte beobachtet werden. Diese sind nach Hartley wahrscheinlich Reaktionsprodukte des Tryptophans (19), da sie nur bei der Säurehydrolyse tryptophanhaltiger Peptide gesehen werden. Bei der Säurehydrolyse von Tryptophan konnten diese Artefakte ebenfalls festgestellt werden. Neben den obengenannten DANS-Aminosäuren konnte noch ein sehr schwacher Fleck entdeckt werden, der sich chromatographisch wie DANS-Glycin verhielt.

Derselbe Fleck trat bei der Inkubation von Pferde Cytochrom c auf, dessen N-terminales Ende ein Acetylglycin ist. Versuche mit 0,1 - 0,25mg Trypsin erbrachten einen großen Ertrag an DANS-Isoleucin. Dies kann als Hinweis dafür gedeutet werden, daß das Fehlen einer nachweisbaren endständigen NH_2 -Gruppe beim Tubifex Cytochrom c nicht durch einen Fehler im angewendeten Verfahren bedingt ist.

DISKUSSION

Die Darstellung des Tubifex Cytochrom c erwies sich als sehr schwierig. Alle in der Literatur zur Isolierung von Cytochrom c angegebenen Wege führten anfangs nicht zu dem gewünschten Ziel. Erst die Kombination verschiedener Schritte führten zu einem Cytochrom c, das als weitgehend gereinigt angesehen werden kann.

Eine Konzentrierung mittels Ionenaustauschern (Duolite CS-101, Amberlite IRP 64), wie sie Flatmark (8) für das Cytochrom des Rindes beschrieben hat, konnte beim Tubifex Cytochrom c nicht durchgeführt werden. Das einmal von Amberlite IRP 64 eluierte Cytochrom ließ sich ein zweites Mal nicht mehr am Austauscher adsorbieren. Diese Erscheinung war unabhängig vom verwendeten Elutionspuffer. Sie trat bei der Elution mit Natriumphosphat-NaCl-Puffer wie auch mit 2M Ammoniumacetat auf.

Das Aussalzen der Fremdproteine aus der Cytochrom c Lösung mit Ammoniumsulfat erwies sich trotz der hohen Verluste als unumgänglich. Dadurch konnte eine vermutlich enzymatische Zerstörung des Cytochroms verhindert werden, welche bei allen anderen Reinigungsversuchen innerhalb weniger Stunden eintrat. Eine proteolytische Aktivität wurde bereits von Yamanaka (20) bei der Extraktion von Rinder Cytochrom c beobachtet. Er extrahierte daher das Cytochrom c mit Ammoniumsulfat. Dieses Extraktionsverfahren scheiterte hier an der erforderlichen großen Menge Ammoniumsulfat.

Das Extinktionsverhältnis E_{550r}/E_{280} des extrahierten Tubifexcytochroms betrug maximal 1,08 bis 1,09. Damit lag das Cytochrom c vom Tubifex unter dem Wert, der für das Cytochrom c der Wirbeltiere gemessen wurde. Dieser liegt im Durchschnitt bei 1,22 - 1,24. Eine Ausnahme hiervon bildet das Cytochrom c des Thunfischherzens. Bei diesem beträgt das Extinktionsverhältnis 1,04 - 1,06 (30). Nach Margoliash (1c) wird die Größe dieses Wertes entscheidend von der Menge des Tryptophans im Molekül bestimmt. Der niedere

Wert beim Thunfisch wird durch die Anwesenheit von zwei Molekülen Tryptophan im Cytochrommolekül erklärt. Auf Dünnschichtplatten des tryptischen Hydrolysates von Tubifex Cytochrom c konnten durch Färbung mit p-Dimethylaminobenzaldehyd ebenfalls zwei tryptophanhaltige Peptide festgestellt werden. Ähnliches gilt für das Cytochrom c des Karpfenherzens, bei dem ein Absorptionsverhältnis E_{550r}/E_{280} von 1,06 - 1,09 gemessen wurde. (siehe Dissertation von L. Gürtler). Die färberische Feststellung dieser beiden tryptophanhaltigen Peptide ist aber kein Beweis der Existenz zweier Moleküle Tryptophan im Tubifex Cytochrom c. Es könnte eine unvollständige Spaltung eines Peptides durch die begleitende chymotryptische Aktivität der käuflichen Trypsinpräparate vorliegen.

Die vier Cytochrome des extrahierten Tubifex Cytochrom c Präparates, die auf Sephadex G-75 getrennt wurden, sind vermutlich Polymere der monomeren Form (21). Hierfür sprechen folgende Beobachtungen:

- a. Die Absorptionsspektren der vier Cytochrome waren identisch. Alle vier Cytochrome besaßen die für das reduzierte Cytochrom typische Kurve (siehe Abbildung 2). Die Maxima lagen bei den Wellenlängen 415m μ , 516m μ und bei 550m μ , das Minimum lag bei 535m μ .
- b. Das Elutionsmuster von Tubifex Cytochrom c nach der Gelfiltration über eine Sephadex G-75 Säule. Bei der Gelfiltration von Cytochrom c Polymeren vom Pferd wurde von Margoliash eine ähnliche Kurve beobachtet (21). Ihm gelang es, durch Depolymerisation mit Harnstoff und Molekulargewichtsbestimmung die Polymerisation zu beweisen.
- c. Der hohe Wert des Absorptionsverhältnisses E_{550r}/E_{280} der verschiedenen Cytochrome. Dieser Wert soll bei den einzelnen Polymeren des Cytochrom c gleich hoch sein (1c)
- d. Die Ähnlichkeit der Peptidmuster der tryptischen Hydrolysate der vier Cytochrome.

Die Ursache der Polymerisation des Cytochrom c liegt nach Margoliash (1d) in der Behandlung des Cytochrom c Moleküls mit einer Säure. Das Tubifex Cytochrom c wurde bei einem p_H 4,0 mit Schwefelsäure extrahiert und durch Ammoniumsulfat bei einem p_H 5,0 vom Fremdprotein gereinigt. Durch die zweimalige Behandlung des Tubifex Cytochrom c mit einer Säure ist der hohe Anteil der Polymere im extrahierten Cytochrom c Präparat verständlich.

Beim Vergleich der Fingerprintmuster der tryptischen Hydrolysate von Pferde-, Karpfen- und Tubifex Cytochrom c fiel die unterschiedliche Anzahl der Peptide auf (siehe Abbildung 3). Sie dürften durch die wechselnde Menge der basischen Aminosäuren in den Cytochromen, vermutlich aber durch die im Trypsin noch vorhandene chymotryptische Aktivität bedingt sein (22). Diese chymotryptische Aktivität wurde besonders beim Hydrolysieren des Karpfen- und Tubifex Cytochrom c wirksam, da bei diesen beiden eine größere Trypsinmenge bei einer längeren Spaltungszeit eingesetzt wurde (siehe Tabelle 2)

Gemeinsam war allen drei Spezies der relativ hohe Anteil an basischen Peptiden. Die Peptide 1 und 2 (siehe Abbildung 3) traten beim Pferde-, Karpfen- und Tubifex Cytochrom an identischen Stellen auf. Untersuchungen bei Pferde- und Karpfen Cytochrom c (Gürtler unveröffentlicht) zeigten, daß das Peptid 1 reines Lysin war. Peptid 2 bestand beim Karpfen und beim Pferd aus zwei sich überlappenden Peptiden Lys-Lys und Gly-Lys-Lys.

Interessant war das Auftreten der tyrosinhaltigen starken Peptide 9 und 11 bei allen drei Cytochromen. Nach Untersuchungen beim Pferd von Tuppy (21) und beim Karpfen (Gürtler) handelte es sich um Peptide folgender Aminosäurezusammensetzung und Lage im Gesamtmolekül:

Peptid 9 (74-79) Tyr-Ile-Pro-Gly-Thr-Lys

Peptid 11 (73-79) Lys-Tyr-Ile-Pro-Gly-Thr-Lys

Die Zahlen in den Klammern geben die Position, d.h. die Nummer der Aminosäuren im Gesamtmolekül an. Es wurde vom

Aminoende aus gezählt.

Für die Annahme, daß die Peptide 9 und 11 auch beim Tubifex Cytochrom c die obengenannte Zusammensetzung besitzen, spricht folgendes: Beim Pferd, wie auch beim Karpfen stammen diese Peptide aus der Aminosäure-Sequenz 70-80. Diese Sequenz ist bei allen bisher untersuchten Cytochrom c Molekülen invariant (2) und vermutlich für die physiologische Funktion dieses Proteins unentbehrlich. Es ist anzunehmen, daß diese "konstante Sequenz" auch im Tubifex Cytochrom c vorhanden ist. Das Vorkommen der Peptide 9 und 11 kann als Hinweis hierfür betrachtet werden.

Beim Cytochrom c aus Tubifex konnte kein histidinhaltiges Peptid färberisch nachgewiesen werden. Trotzdem ist die Frage nach der Anzahl der Histidinmoleküle im Tubifex Cytochrom c noch offen. Das Histidin in Position 18 neben dem Porphyrinring kann als konstantes unveränderliches Merkmal aller Cytochrom c vorausgesetzt werden. Bei jedem Cytochrom c konnte weiterhin - mit Ausnahme des Cytochrom c von *Pseudomonas fluorescens* (23) und *Neurospora crassa* (6) - ein Histidin in Position 26 nachgewiesen werden. Wäre jetzt bei dem Tubifex Cytochrom c das Lysin in Position 22 und 25 ausgetauscht, so entstünde ein besonders langes Hämopeptid. Dieses würde von Position 14 bis 27 reichen und könnte wie auch das Pferde- und Karpfen Cytochrom c bei 18 und 26 je ein Histidin enthalten. Diese wären wegen der roten Eigenfarbe des Hämopeptides färberisch nicht mehr nachweisbar.

Zum anderen könnte beim Tubifex Cytochrom c, wie bei *Pseudomonas fluorescens* (23) und *Neurospora crassa* (6) das Histidin in Position 26 fehlen. Das Cytochrom c der Mikroorganismen, wie von *Pseudomonas fluorescens*, ist aber nicht gut als Vergleich geeignet, da auf Grund der hohen Generationszahl der Mikroorganismen die Struktur ihrer Cytochrome starke Abweichungen zeigt (6). Cantor (7) konnte zwischen dem Cytochrom von *Pseudomonas fluorescens* und dem des Menschen kaum noch Gemeinsamkeiten feststellen.

Im Karpfen Cytochrom c zeigten sich zwei tryptophanhal-

tige Peptide. Diese wurden bereits im Cytochrom eines anderen Fisches, des Thunfisches festgestellt (30). Zwei Tryptophanpeptide traten ebenfalls im Tubifex Cytochrom c auf. Die färberische Feststellung zweier tryptophanhaltiger Peptide im tryptischen Hydrolysat von Tubifex Cytochrom c beweist aber nicht die Existenz zweier Moleküle Tryptophan. Es könnte eine unvollständige Spaltung eines Peptides durch die begleitende chymotryptische Aktivität der käuflichen Trypsinpräparate vorliegen.

Die Differenzen der Fingerprint-Muster der tryptischen Hydrolysate der vier Tubifex Cytochrome können verschieden gedeutet werden.

Es besteht eine nachgewiesene unterschiedliche Empfindlichkeit der Cytochrom c Polymere gegenüber proteolytischen Enzymen (24). Diese veränderte Empfindlichkeit gegenüber proteolytischen Enzymen, wie auch die veränderte Reaktionsfähigkeit der Cytochrom c Polymere mit Kohlenmonoxyd und Sauerstoff wurde von Margoliash auf eine Änderung der Tertiärstruktur des Cytochroms bei der Polymerisation zurückgeführt (1e).

Eine andere Erklärungsmöglichkeit dieser Unterschiede wäre das Vorhandensein zweier Cytochrome im Ausgangspräparat. So könnten sich die Cytochrome der beiden im Ausgangsmaterial nachgewiesenen Tubifex-Arten geringfügig in ihrer Aminosäure-Sequenz unterscheiden.

Die Komponenten, die mit der Disk Elektrophorese beim Pferde-, Karpfen- und Tubifex Cytochrom c beobachtet wurden, entsprachen der von Flatmark beobachteten Heterogenität des Rindercytochroms (25). Flatmark beobachtete beim Rinder Cytochrom c vier "Subfraktionen" und führte diese Heterogenität auf die unterschiedliche Anzahl der Amidogruppen im Cytochrom c Molekül zurück (26). Er konnte das reduzierte und das oxydierte Cytochrom, wie auch diese desaminierten Formen mit der Disk Elektrophorese trennen. Mit Ammoniumsulfatbehandlung gelang ihm eine rasche Umwandlung dieser "Subfraktionen". Margoliash beschrieb (1f) eine Reihe von desaminierten Cytochrom c Formen, die er bei der Säureextraktion

von Cytochrom c beobachtete (1d).

Bei allen bisher untersuchten Wirbeltieren war das N-terminale Ende des Cytochrom c N-acetyliert. Die Motte und die Mikroorganismen wiesen statt dessen ein freies, um vier bis fünf Aminosäuren längeres Aminoende auf. Aus diesem Grund schien die Bestimmung des NH_2 -Endes vom Cytochrom beim Tubifex besonders wichtig zu sein. Aus Materialmangel konnte die Sangersche DNP-Methode, wie auch die Edmansche PTH-Methode nicht angewendet werden (27).

Geeignet dagegen schien die Markierung mit DANS-Cl zu sein. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 10^{-4} Mikromol pro Aminosäure (28). Trotz der hohen Empfindlichkeit dieser Methode konnte keine freie α -Aminogruppe gefunden werden. Selbst, wenn die Zerstörung des markierten Glycins bei der Säurehydrolyse (29) in Betracht gezogen wurde, so stand dessen gefundene schwache Intensität in keinem Verhältnis zur eingesetzten Proteinmenge. Zum anderen wurde dieser Glycinleck auch beim Pferde Cytochrom c gefunden, dessen N-terminales Ende acetyliert ist.

Somit bleibt die Frage noch offen, ob Tubifex Cytochrom c ein acetyliertes oder ein freies α -Amino-Ende besitzt.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus dem Oligochäten Tubifex konnte ein Cytochrom c Präparat isoliert werden, das sich durch Gelfiltration über eine Sephadex G-75 Säule in vier verschiedene Cytochrome auftrennen ließ. Die Art dieser Cytochrome wurde diskutiert. Für das erhaltene Präparat konnte ein Extinktionsverhältnis $E_{550r}/E_{280} = 1,08 - 1,09$ gemessen werden. Ein Vergleich der Fingerprint-Muster der tryptischen Peptide von Pferde-, Karpfen- und Tubifex Cytochrom c wurde vorgenommen. Das Cytochrom IV vom Tubifex ließ sich mit der Disk Elektrophorese in fünf "Subfraktionen" unterteilen. Mit DANS-Cl konnte bei dem Tubifex Cytochrom IV kein freies α -Amino-Ende festgestellt werden.

LITERATUR

- 1) E.Margoliash und A.Scheyter, "Advances in Proteinchemistry" Academic Press, New York, Band 21, (1966)
 - 1a) Seite 172
 - 1b) Seite 157
 - 1c) Seite 140
 - 1d) Seite 139
 - 1e) Seite 134
 - 1f) Seite 135
- 2) E.Margoliash und E.Smith, in: V.Bryson und H.J.Vogel "Evolving Genes and Proteins" Academic Press, New York, (1965) S221 -242
- 3) K.Narita, K.Titani, Y.Yaoi und H.Murakami, Biochim. biophysica Acta 77,688,(1963)
- 4) K.Narita und K.Titani, Proc. Japan Acad. 41,831,(1966)
- 5) S.Chan und E.Margoliash, J. biol. Chemistry 241,339,(1966)
- 6) J.Heller und E.Smith, Proc.nat.Acad.Sci. 54,1621,(1965)
- 7) Ch.Cantor und Th.Jukes, Proc.nat.Acad.Sci. 56,177,(1966)
- 8) T.Flatmark, Acta chem. scand. 18,1517,(1964)
- 9) H.Tuppy und K.Dus, Mh.Chem. 89,407,(1958)
- 10) B.Hagihara, H.Takakezu, Y.Jinpei, M.Nozaiki und K.Okunuki, Nature 178,629,(1956)
- 11) Ch.Anfinsen, S.Aquist, J.Cooke und B.Jönssen, J. biol. Chem. 234,1119,(1965)
- 12) Th.Wieland und D.Georgopoulos, Biochem.Z. 340,476,(1964)
- 13) F.Sanger und H.Tuppy, Biochem.J. 49,466,(1951)
- 14) I.Smith, Nature 171,43, (1953)
- 15) R.Acher und Ch.Crocker, Biochim.biophysica Acta 9,704,(1952)
- 16) H.Taber und F.Sherman, Ann.N.Y.Acad.Sci. 121,600,(1966)
- 17) G.Schmer, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 348,199,(1967)
- 18) H.Wiechmann und N.Seiler, Experientia 20,559,(1964)
- 19) D.Morse und B.Horecker, Analyt.Biochem. 14,429,(1966)
- 19) B.S.Hartley und V.Massey, Biochim.biophysica Acta 21,59,(1956)

- 20) T.Yamanaka, H.Mizushima, M.Nozaki und T.Horio,
J.Biochemistry 46,121,(1959)
- 21) E.Margoliash und J.Lustgarten, J.biol.Chemistry
237,3397,(1962)
- 22) H.Tuppy und G.Kreil, Mh.Chem. 93,780,(1962)
- 23) R.P.Ambler, Biochem.J. 89,349,(1963)
- 24) M.Nozaki, J.Biochemistry 47,592,(1960)
- 25) T.Flatmark, Acta chem. scand. 18,1656,(1964)
- 26) T.Flatmark, Acta chem. scand. 20,1487,(1966)
- 27) Y.Yaoi, K.Titani, und K.Narita, J. Biochemistry
56,222,(1964)
- 28) W.R.Gray und B.S.Hartley, Biochem.J. 89,598,(1963)
- 29) I.Dawid, Th.French und J.Buchanan, J.biol.Chemistry
238,2178,(1963)
- 30) G.Kreil, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 334,154,(1963)
- 31) C.Nolan und E.Margoliash, in P.D.Boyer "Annual Review
of Biochemistry" Palo Alto, Californien,
37,727,(1968)

Herrn Prof. Dr. Dr. F. May bin ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Physiologisch-Chemischen Institut zu hohem Dank verpflichtet.

Danken möchte ich Herrn Doz. Dr. H-J. Horstmann für die ständige großzügige Hilfe und die wertvollen Hinweise und Diskussionen.

Lebenslauf

Ich, Arnulf Ewald Hennig, wurde am 18.10.1943 als drittes Kind des Chemikers Dr. Bruno Hennig und seiner Ehefrau Magda Hennig, geborene Roßberg, in Nietleben - Halle/Saale - geboren.

Im Oktober 1946 wurde mein Vater als deutscher Spezialist nach Dsershinsk in Rußland zusammen mit seiner Familie verschleppt. Ich wurde 1949 in einer russischen Schule in die 1. Klasse eingeschult. Nach der Rückkehr in die Ostzone besuchte ich von 1951 bis 1957 die Grundschule in Bitterfeld. 1957 wechselte ich auf die Oberschule II in Bitterfeld über. Seit Dezember 1958 befinde ich mich in der Bundesrepublik Deutschland, wohin unsere Familie aus politischen Gründen flüchten mußte. Im Januar 1959 wurde ich in die Oberrealschule Marktredwitz aufgenommen, wo ich 1962 das Abitur bestand.

Im Wintersemester 1962 begann ich an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen das Studium der Medizin. Das Physikum legte ich Februar 1965 ab. Im Sommer 1968 beendete ich mein Studium mit dem medizinischen Staatsexamen.

Im Mai 1965 begann ich unter der Leitung von Herrn Doz. Dr. H-J. Horstmann im Physiologisch-Chemischen Institut der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen mit der vorliegenden Dissertation.

Am 1. September 1968 wurde ich in der Universitäts-Frauenklinik Erlangen als Medizinalassistent eingestellt.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990
